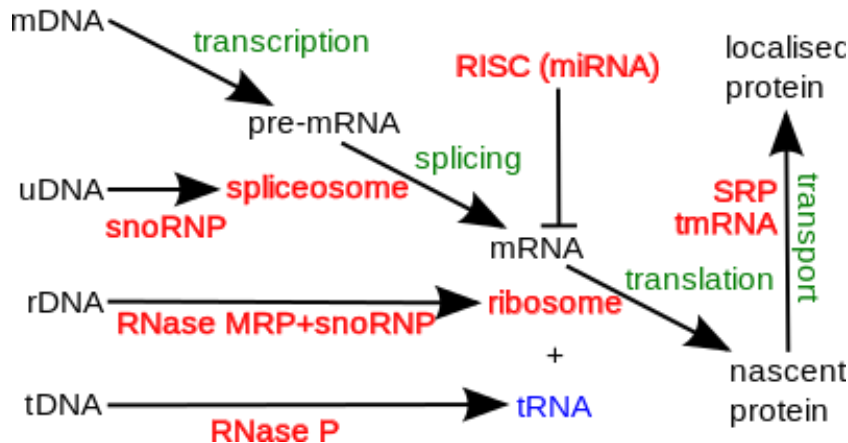


Non-coding RNA 의 소개 및 연구동향

Non-coding RNA 는 DNA 에서 전사되었으나 단백질로 번역되지 않는, 즉 coding 되지 않는 RNA 를 총체적으로 이르는 말이다[1]. 최근 연구에서는 이러한 ncRNA 를 동정하는 기술들이 발전함에 따라 coding RNA 뿐만 아니라 ncRNA 가 유전체 정보 발현 조절인자로서 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다.



https://en.wikipedia.org/wiki/Non-coding_RNA

위 그림에서는 Central Dogma 에서의 ncRNA 역할을 볼 수 있는데, 이들은 여러 그룹에 속해지며 많은 세포 과정에 관여하고 있다[2]. ribosomal RNA 는 번역 중 ribosome 을 구성하고, microRNA 는 비정상적인 mRNA 의 분해를 촉진하며, snRNA 는 RNA splicing 반응을 수행 및 조절하기도 한다. enhancer RNA 는 인핸서 영역에서 유전자 발현을 촉진하거나 조절하기도 하고, piRNA 는 세포에서 감염을 보호하는 데 도움이 되기도 한다. 또한 lncRNA 는 X 염색체의 활성화 조절을 통해 전사의 후성적인 조절도 가능하며 호르몬 경로 조절을 통해 내분비 기관의 발달에도 중요한 역할을 한다. 이러한 역할로 보았을 때 ncRNA 는 크게 전체적인 기반을 이루는 housekeeping ncRNA 와 여러 반응을 조절하는 regulatory ncRNA 로 나눌 수 있다. Housekeeping ncRNA 에는 Ribosomal RNA, Spliceosome RNA, tRNA, snoRNA 가 포함되어 있고, Regulatory ncRNA 에는 microRNA, siRNA, piRNA, lncRNA 가 포함되어 있다. 이들은 각각 단백질과 마찬가지로 신체 내에서 돌연변이 또는 불균형을 통해 질병을 유발할 수도 있는데 암, 자폐증, 알츠하이머 등과 같은 질병 뿐만 아니라 청력 상실과 같은 장애를 야기하기도 한다. 때문에 이러한 연구는 mRNA 와 같은 coding RNA 와 더불어 점진적으로 발전하고 있다.

[Regulatory non-coding RNA]

- microRNA

microRNA 는 21~24nt 의 사이즈로, mRNA 를 타겟 하여 유전자의 발현을 줄이거나 억제하는 역할을 한다. microRNA 는 타겟 mRNA 의 3'-UTR 영역의 서열과 상보적인 서열을 지니고 있는데, 이 부분을 seed sequence 라고 한다. 이는 타겟 mRNA 와 매치되기 때문에 이를 기반으로 mRNA 와의 상호작용을 통해 유전자 발현 조절을 하게 된다. 때문에 하나의 microRNA 는 수백가지의 다른 mRNA 를 조절하고, 하나의 mRNA 는 다수의 microRNA 에 의해 조절된다[12].

- piRNA

piRNA(piwi-interacting RNA)는 26~32nt 사이즈로, 동물세포에서 발현되는 micro 한 ncRNA 중에서 가장 큰 범위를 차지하고 있으며, Argonaute 단백질의 piwi(P-element Induced Wimpy Testis) 서브 패밀리와 복합체를 이루고 있다[3]. 이러한 복합체는 생식세포에서 유전자 침묵(특히 레트로트랜스포존에서)을 통해 정자형성 과정에 필수적인 것으로 밝혀졌다.

- circular RNA

circular RNA 는 닫혀 있는 형태의 연속적인 루프형식으로 존재하는 단일 가닥 RNA 의 한 유형이다. 백스플라이싱을 통해 생성되며, 루프 형태로 이루어져 있기 때문에 exonuclease 에 내성이 어느정도 있어서 일반적인 선형 RNA 보다 더 안정적이다. 이들은 유전자 조절의 기능을 가지는 한편 일부 단백질을 암호화하기도 하는 것으로 밝혀졌다[4]. 또한 스플라이싱과 mRNA 의 발현을 억제하는 microRNA 와의 상호작용을 통해 유전자의 발현을 조절함으로써 전사체의 복잡도와 다양성에 기여한다[5].

- long non-coding RNA (lncRNA)

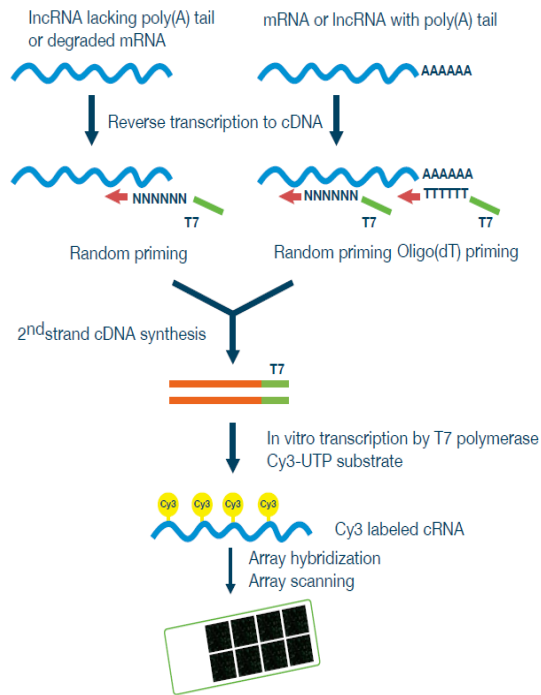
lncRNA 는 일반적으로 단백질로 coding 되지 않는 200nt 이상의 ncRNA 들을 총칭한다[6]. 세포 내에서 생존, 증식, 성장억제, 운동성, 불멸성, 신생혈관형성 등에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. 이러한 기능과 연관되어 다양한 질병에서 lncRNA 발현 및 돌연변이의 특이적인 패턴을 확인할 수 있는데, 이를 통해 lncRNA 는 바이오 마커 로서 임상적인 중요성이 증대되고 있다.

[ncRNA profiling technology]

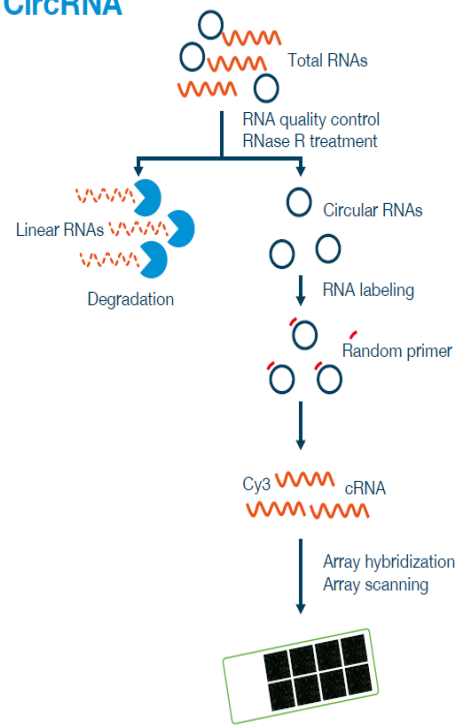
위에서 regulatory ncRNA 에 대해서 나열해보았는데, ncRNA 도 mRNA 와 같이 NGS 방식 혹은 microarray 방식을 통해 profiling 이 가능하다. microRNA 같은 경우는 이바이오젠에서 NGS(small RNA-seq) / microarray (Affymetrix) 서비스를 직접 제공하고 있으며, piRNA, circular RNA, lncRNA 경우는 이바이오젠의 글로벌 협력파트너인 Arraystar 를 통해 microarray 서비스를 제공하고 있다. Arraystar 는 2009년 창립되어 ncRNA 를 중점적으로 전사체, 후성 유전체 분석을 폭넓게 지원한다.

Microarray 서비스는 기존 chip 방식과 동일하게 부착된 probe 와 형광물질이 labeling 된 시료의 hybridization 즉, 상보적 결합 과정에서 나타나는 형광 강도를 스캔하여 RNA 발현 분석을 진행한다. 아래 그림에서 각 ncRNA 들의 workflow 를 소개하고 있는데[7], 우선 lncRNA 는 T7 ligase 를 이용하여 Cy3 가 labeling 되며, lncRNA 의 경우 poly(a) 를 가진 RNA 도 함께 priming 되기 때문에 어느 정도의 mRNA 와 lncRNA 를 같이 확인할 수 있다. 그리고 circular RNA 는 RNase R 을 처리하여 선형의 RNA 들은 모두 제거하고, 남아있는 circular RNA 만을 priming 하여 Cy3 를 labeling 한다. circular RNA microarray 서비스는 루프형식으로 이루어져 있는 circular RNA 의 특성으로 인해 NGS 서비스보다 탁월하게 접근할 수 있다. 아래 그림에 포함되지 않은 piRNA 는 T4 ligase 에 의한 탈인산화를 이용하여 Cy3 를 labeling 하는데, oligonucleotide probe 를 이중으로 디자인하여 보다 정확하게 확인이 가능하다.

LncRNA



CircRNA

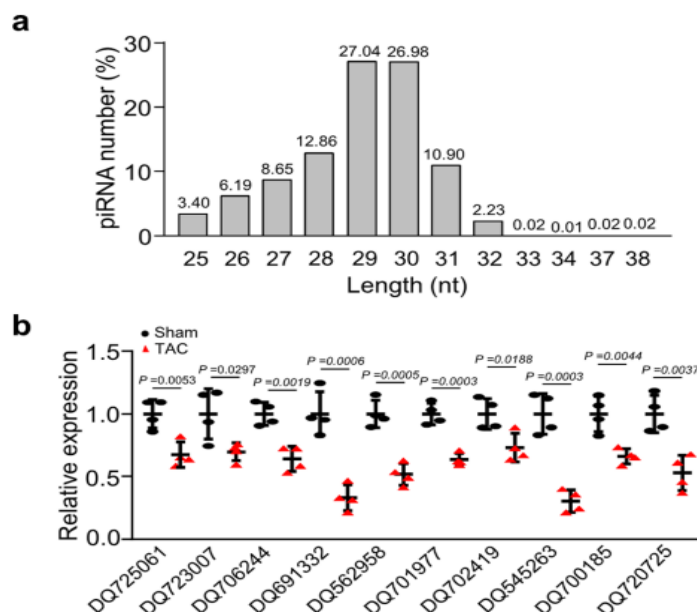


E-biogen Catalog, 2022

[ncRNA research trend]

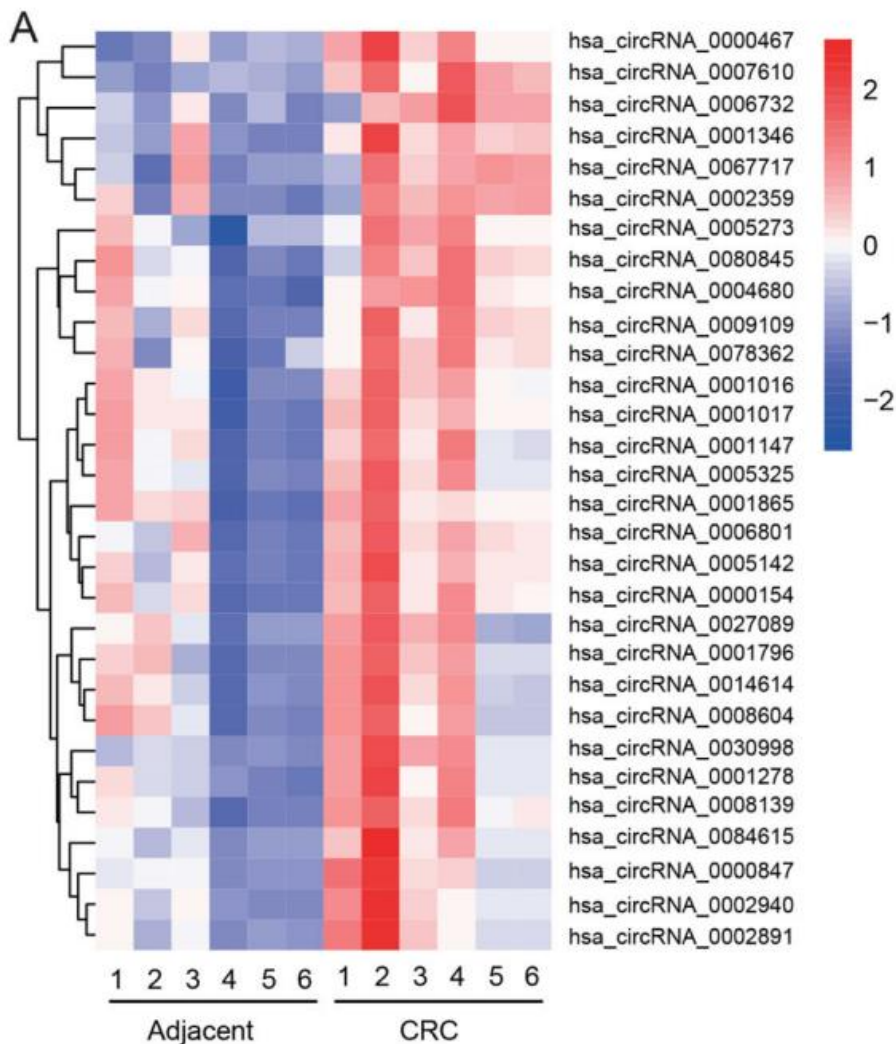
많은 ncRNA 들은 질병과 관련하여 임상연구가 이루어지고 있고 상당부분 바이오 마커로서 다양한 적용이 기대되고 있다. 앞서 소개한 내용을 토대로 Arraystar 에서 게재한 논문들을 다뤄보고자 한다.

첫번째 논문은 mRNA 의 메틸화에 관련된 piRNA 가 심장 비대증을 조절한다는 내용이다. 이 논문에서는 CHAPIR 를 과다 처리한 Mouse(TAC 모델)에서 Parp10 의 m6A 메틸화가 차단되어 심장 비대증이 강화되는 것을 발견했다. 이를 통해 Parp10 의 METTL3-N6-methyladenosine(m6A) 메틸화를 타겟 하는 piRNA CHAPIR 의 감소가 심장 비대증을 약화시키고 심장의 기능을 회복시킨다는 사실을 증명하였다[8]. 아래 그림 a 는 TAC 모델 Mouse 에서 찾아낸 piRNA 의 길이 별 분포를 보여주고, 그림 b 는 상향 조절된 상위 10 개 piRNA 를 나타낸다.



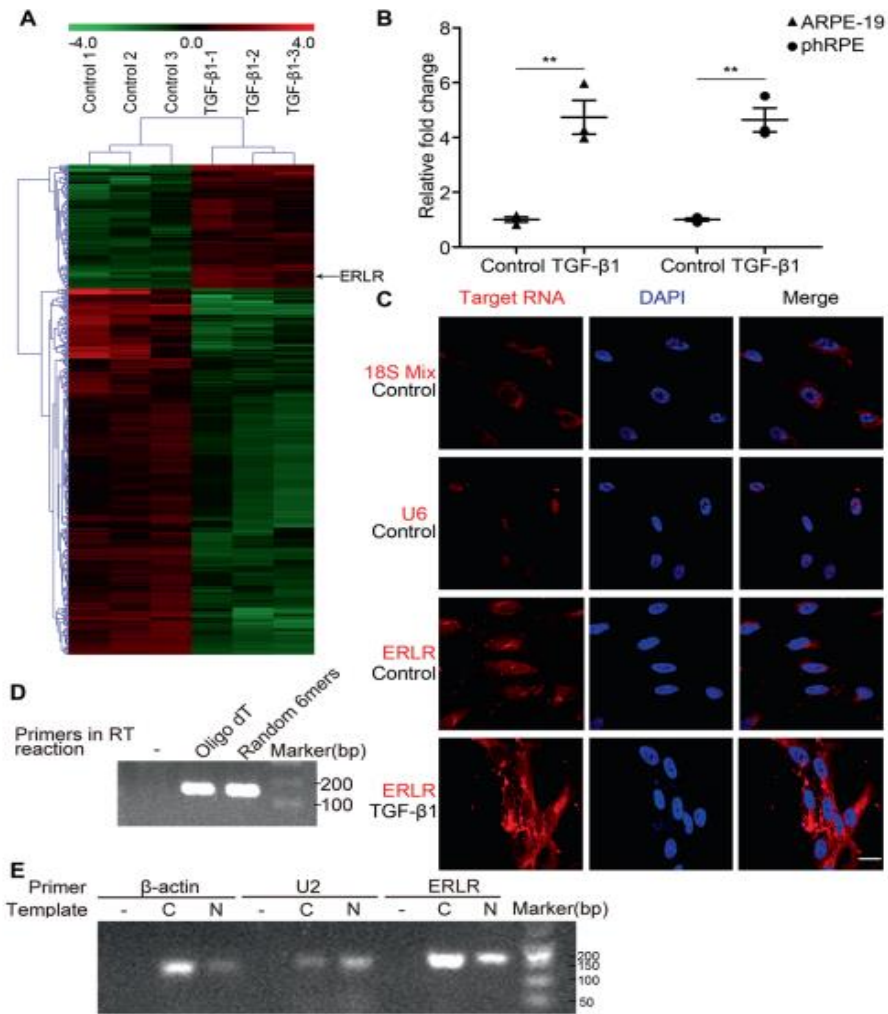
The piRNA CHAPIR regulates cardiac hypertrophy by controlling METTL3-dependent N6-methyladenosine methylation of Parp10 mRNA, nature cell biology, 2020

두번째 논문은 circular RNA 의 종양 형성 조절 관련 내용이다. CRC(colorectal cancer, 대장암) 조직과 인접 비 종양 조직을 비교하여 circPTK2 의 유의한 변화를 찾아냈고, 대장암에서의 간, 폐 전이 실험을 통해 circPTK2 와 vimentin 의 상호작용이 대장암의 전이에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀냈다[9]. 이를 통해 circPTK2 가 바이오 마커로서 종양 조기 발견 및 전이 진단에 대한 잠재적인 치료 타겟으로의 가능성을 가진 것을 확인했다. 아래 그림 a 는 대장암 조직과 비 종양 조직의 heatmap 분석 그래프이다.



CircPTK2 (hsa_circ_0005273) as a novel therapeutic target for metastatic colorectal cancer, *Molecular Cancer*, 2020

마지막 논문은 세포에서의 EMT(Epithelial-mesenchymal transition)에 관한 내용이다. 이 논문에서는 망막색소상피세포(RPE)에 TGF-beta1 을 처리하여 EMT 를 유도하고, 그로 인한 질병을 야기시켰다. 이때 상향 조절된 lncRNA 들은 EMT 에서 필수적인 역할을 하여 ERLR(EMT-related lncRNA)라고 명명하였다[10]. 아래 그림에서는 ERLR 의 heatmap 분석과 FISH 분석을 통해서 ERLR 이 세포질에서 많이 발현된다는 것을 볼 수 있다

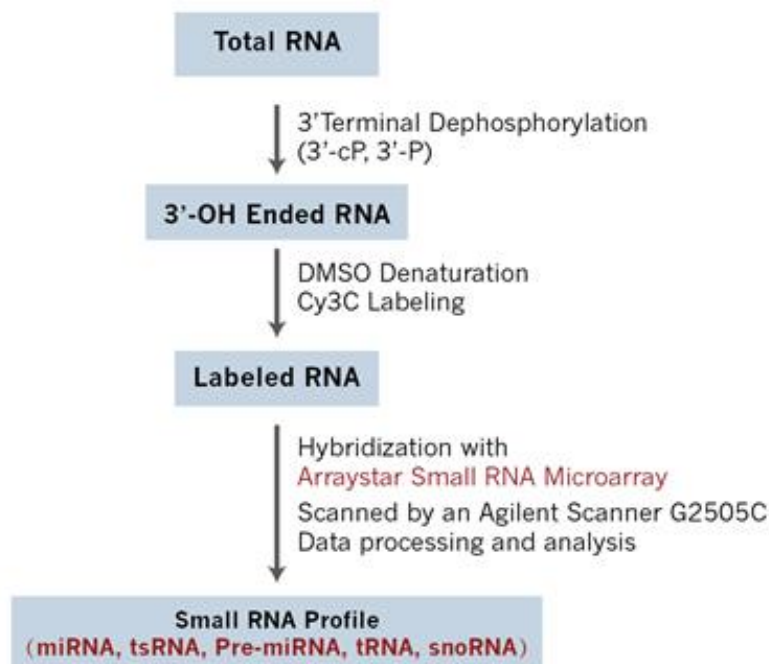


Long noncoding RNA ERLR mediates epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells and promotes experimental proliferative vitreoretinopathy, *Cell Death & Differentiation*, 2020

이처럼 앞서 소개한 3 개과 함께 piRNA, circular RNA, lncRNA 에 대한 분석은 질병과 관련되어 많은 연구가 진행되고 있다. mRNA 혹은 microRNA 와 상호작용하여 발현조절이 일어나는 것을 볼 수 있는데, 정확하게 어떤 질병의 어떤 메커니즘에 의존하는지에 대한 것은 여전히 밝혀지지 않았고 연구는 점차 발전 중이다.

[ncRNA profiling service]

이바이오젠은 non-coding RNA 를 전문적으로 분석하는 Arraystar 를 통해서 Microarray 서비스를 연구자들에게 제공하고 있다. 기본적으로 Differentially expressed ncRNAs profiling, plot(scatter, volcano), Clustering heatmap 및 Gene Ontology 등 분석적으로도 지원하고 있다[11]. 특히 아래 그림과 같이 small RNA Array service 는 miRNA, pre-miRNA, tsRNA, tRNA, snoRNA 와 같은 주요 small RNA class 에 대해서 한번의 실험으로 분석이 가능하다. small RNA-seq 으로는 library 를 구축하는 방법의 차이에 따라서 micro RNA-seq 과 tRNA-seq 를 함께 분석할 수 없는데, 이것이 가장 큰 차이점이라고 볼 수 있으며 Arraystar small RNA Array service 의 장점이라고 볼 수 있다.



Arraystar Small RNA Array Profiling workflow, <https://www.arraystar.com>

	piRNA microarray	circularRNA microarray	lncRNA microarray	Small RNA Array
Species	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse/Rat	Human/Mouse
Probe site	piRNA	Targeting circular RNA Specific junctions	mRNA and lncRNA	miRNA, pre-miRNA, tsRNA and tRNA&snoRNA
Array format	4 X 44k	8 X 15k	8 X 60k	8 X 15k

<https://www.arraystar.com>

< 참고 문헌 >

1. Wikipedia, Non-coding RNA, https://en.wikipedia.org/wiki/Non-coding_RNA
2. Computational Identification of piRNAs Using Features Based on RNA Sequence, Structure, Thermodynamic and Physicochemical Properties, 2019
3. Molecular Biology Select, Cell, 2006. 126(2): p.223-225
4. New study shows circular RNA can encode for proteins, Science Daily, 2017
5. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs, Nature reviews Molecular cell biology, 2016. 17.4: 205-211
6. Visiting "Noncodarnia", BioTechniques, 2013. 54(6): p.301, 303-304
7. E-biogen Catalog, 2022
8. The piRNA CHAPIR regulates cardiac hypertrophy by controlling METTL3-dependent N6-methyladenosine methylation of Parp10 mRNA, nature cell biology, 2020
9. CircPTK2 (hsa_circ_0005273) as a novel therapeutic target for metastatic colorectal cancer, Molecular Cancer, 2020
10. Long noncoding RNA ERLR mediates epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells and promotes experimental proliferative vitreoretinopathy, Cell Death & Differentiation, 2020
11. Arraystar, Rockville, <https://www.arraystar.com>
12. Bartel DP (January 2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". Cell 136 (2): 215-33. Doi:10.1016/j.cell.2009